

薬用植物トコンの不定器官形成による増殖および催吐アルカロイド分析に関する研究

著者	磯貝 里子
学位授与大学	東洋大学
取得学位	博士
学位の分野	生命科学
報告番号	甲第200号
学位授与年月日	2008-03-25
URL	http://id.nii.ac.jp/1060/00003961/

薬用植物トコンの不定器官形成による増殖および 催吐アルカロイド分析に関する研究

4910050001 磯貝 里子

【緒言】

トコン (*Cephaelis ipecacuanha* A. Richard) は、アカネ科 (Rubiaceae) に属する高さ 20~40 cm の低木で、ブラジルの暗い湿潤な森林中に自生する。根を“吐根”と称し、催吐剤、去痰剤、アメーバ赤痢の治療薬として用いられている重要な薬用植物である。

トコンは、イソキノリンアルカロイドである emetine (EM), cephaeline (CP) を含有しており、EM は CP に比べて去痰作用が強く催吐作用が弱い。さらに、*Cephaelis* 属植物は、種あるいは産地により EM と CP の含有比が異なる。市場品の吐根は、その原植物あるいは原産地の由来が不明瞭な場合があり、また、品質が一定していないことが報告されている。最も良品とされているブラジル原産の吐根は野生植物の採取に依るが、種子からの栽培では収穫までに 3 年余りかかることや、生育地であるアマゾン河流域の開発の進行により入手が困難になっている。そこで、品質が均一なトコンを短期間で大量に得るため、Yoshimatsu らのグループおよびインドの研究者グループにより、植物組織培養による大量増殖法について研究されてきた (Fig. 1)。近年、我国においても救急医療現場でトコン製剤を使用するようになり、原材料を輸入に頼っている現状から、トコンの安定供給が求められている。

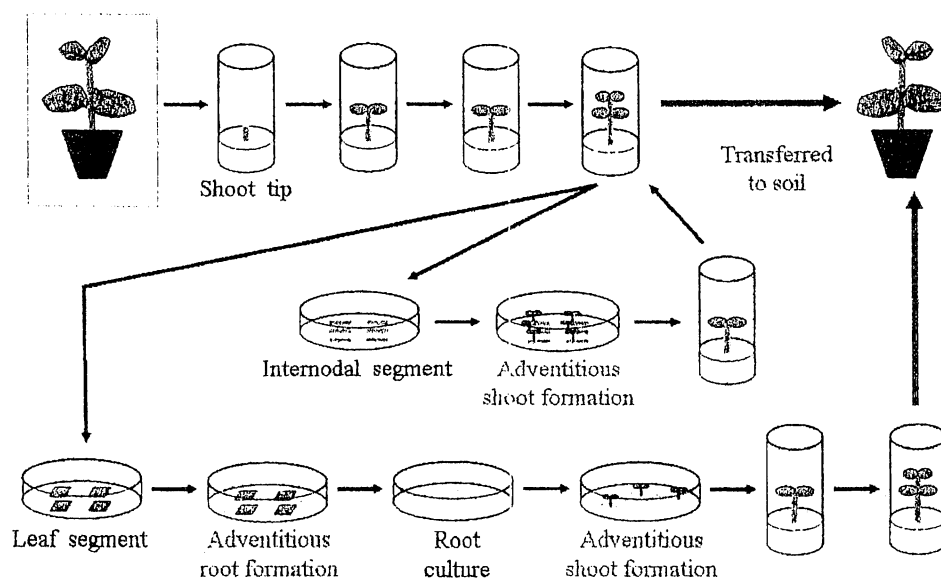


Fig. 1 これまでに確立されたトコンの再生系の模式図

これまでに確立されたトコン植物体の増殖方法のうち、1つの外植片から最も多くの個体を再生できるのは、Yoshimatsu らが報告した節間切片からの不定芽形成による増殖法である。トコン培養シュートの節間から長さ約 6 mm の切片を調製し、0.01 mg/L N^6 -benzyladenine (BA) 添加 Woody Plant (WP) 固形培地に植え付け培養すると、切片の表面に 6 個から 13 個の不定芽が形成される。

本研究では、さらに増殖効率を上げるため、＜1＞節間切片からの不定芽形成による増殖法にジベレリン（GA₃）を用い、その効果を検討した。また、節間切片からの不定芽形成において、形成される不定芽の部位に極性が認められること、加えて、先に形成された1～2本の不定芽が生育すると、遅れて形成される他の不定芽の生育（伸長）が抑制される傾向があることを見出した。これは、培養系における一種の頂芽優勢の現象であると考えられ、オーキシンの影響が推定された。そこで、＜2＞不定芽形成過程におけるオーキシンおよびサイトカイニンレベルを調査した。

また、形成された不定芽のアルカロイド含量を分析するため、＜3＞従来法よりも微量の試料で精密に分析できる HPLC 分析条件を確立し、微量分析を行なった。

【研究結果】

＜1＞トコンの不定芽形成による効率的増殖法の検討

上記のように、トコンの培養による増殖法に関してはいくつかの手法が報告されており、節間切片からの不定芽形成による増殖法は、1つの外植片から最も多くの個体を再生できる。しかし、トコンは木本植物であり、*in vitro* では増殖に十分な節間切片を得られるまで非常に時間がかかる。そこで、シュートを培養する際に GA₃ を添加し、節間を伸長させて切片を大量に得る方法について検討した。また、これまで、培養シュートに対する GA₃ の影響についての報告はない。そこで、トコン培養シュートに GA₃ を与え、生育とアルカロイド含量に対する影響を調査した。さらに、GA₃ 処理シュートの節間切片から再生した植物体を1年間ビニルハウス内で栽培し、根のアルカロイド含量を分析した。

Phytohormone free (HF)-Gamborg B5 (B5) 固形培地で継代維持しているトコン無菌培養シュートを、0.1、0.5 および 1 mg/L GA₃ 添加 B5 固形培地に移植し、25℃、14 時間弱照明下にて4週間培養した。0.5 あるいは 1 mg/L GA₃ を添加して培養したシュートは、頂芽の直下の節間の伸長が観察され、その長さは GA₃ 未処理シュートの2倍以上であった。0.1 mg/L GA₃ を添加したシュートでは、節間の伸長はほとんど認められなかった。そこで、培養4週目に培養シュートの葉を収穫し、凍結乾燥後、催吐アルカロイドの HPLC 分析を行なった。0.5 または 1 mg/L GA₃ 添加培地で培養した場合、CP の含量が未処理シュートと比較して高かった。しかしながら、どの GA₃ 処理区においても EM と CP の含有比率は、これまでの報告と一致していた。

GA₃ 処理により伸長したシュートの節間から切片を材料として不定芽誘導を行ない、未処理のものと同様に不定芽が形成されるかを調査した。各濃度の GA₃ 処理シュートおよび未処理シュートの節間から長さ約 6 mm の切片を調製し、0.01 mg/L BA 添加 WP 固形培地に植え付け、不定芽誘導を行なった。培養4週間後、実験を行なったすべての節間切片において不定芽形成が認められた。しかし、GA₃ 処理シュートの節間切片に形成された不定芽数は、未処理シュートの節間切片に形成された不定芽数と差があり、添加した GA₃ の濃度が高くなるに伴い、形成された不定芽数は減少した。しかし、0.5 および 1 mg/L GA₃ を添加して培養したシュートの節間切片に形成された単離可能な不定芽数は、GA₃ 未処理の場合と同程度であった。

トコンのアルカロイド生産能に対する GA₃ の影響を明らかにするため、GA₃ 処理シュートの節間切片から再生したシュートの葉のアルカロイド含量を調査した。0.5 および 1 mg/L GA₃ 処理した培養シュートのアルカロイド含量が未処理シュートよりも高かったのに対し、GA₃ 処理したシ

シュートの節間切片から再生したシュートの葉のアルカロイド含量は、未処理の場合と同等であった。

さらに、GA₃ 処理シュートの節間切片から再生した個体を 1 年間土壌栽培し、根のアルカロイド含量を HPLC 分析した (Fig. 2)。GA₃ 処理シュートの節間切片から再生した個体の根のアルカロイド含量は、培養シュートの葉と同様に、未処理シュートの節間切片から再生した個体と同等であった。また、本実験で得られた含量の値はこれまでの報告とほぼ一致していたことから、GA₃ を用いた本増殖法により増殖した植物体は、生薬および救急医療用のトコン製剤の原料として用いることが可能である。

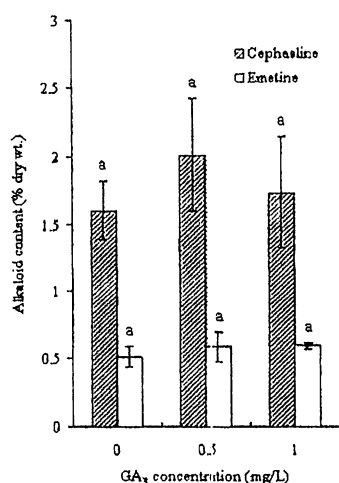


Fig. 2 土壌栽培した再生個体の根のアルカロイド含量

GA₃ を用いた本増殖法は、より多くのトコン植物体を得ることができる高効率の増殖システムであり、理論値で、GA₃ 未処理の報告されている増殖法と比較して 1 年間でおおよそ 120 倍もの数の植物体を得ることが可能となった。また、GA₃ は植物の伸長生長を促進することはよく知られているが、今回、培養系において植物体の増殖に応用した数少ない例の 1 つと言える。

<2> 不定芽形成における植物ホルモンレベル

不定芽形成過程のトコン節間切片における植物ホルモンレベルの変化を調査した。植物組織培養においては、一般的に種々の植物ホルモンを培地に添加することにより分化をコントロールする場合が多い。しかし、トコンの節間切片は、植物ホルモン無添加の場合でもほぼ 100 % の高頻度で不定芽を形成する。よって、不定芽形成過程において、内在性のホルモンのみを分析することが可能である。

トコン培養シュートの節間から長さ約 6 mm の切片を調製し、HF-WP 固形培地に植え付け不定芽誘導を行なった。節間切片は、培養 0, 7, 10, 14, 21, 28, 49 日目に、頂芽側の切断面から 3 mm を頂芽側、残りの部分を基部側とし、分けて収穫した。植物ホルモンの定量は Phytodetek[®] Test Kit を用いて ELISA 法により行なった。

節間切片における不定芽形成過程の IAA レベルの変化を経時的に調査した (Fig. 3)。IAA は、

不定芽形成が確認され始める誘導 10 日目から検出され、21 日目に最大値を示した。その後、IAA 含量は低下し、28 日目と 49 日目では差が認められなかった。このことから、不定芽の生育段階において IAA の生産が制御されている可能性が示された。また、節間切片の基部側と比較して、頂芽側に IAA 分布が片寄っていた。これは、節間切片に形成された不定芽を切除せずに節間切片と共に収穫および分析を行なったため、不定芽において生産された IAA が頂芽側の切片の IAA 含量に含まれているためと考えられた。しかし、不定芽誘導 49 日目の節間切片と形成された不定芽を分割して IAA の分析を行なった結果、不定芽の IAA 含量は微量であり、上述と同様に節間切片では頂芽側に IAA 分布が片寄っていた。また、IAA が頂芽で生産され根に向かって移動していることを確認するため、葉を切除した培養 16 週目のトコンシュートを頂芽、茎および根に分けて収穫し、それぞれ IAA の分析を行なった。その結果、IAA は根に多く分布しており、頂芽の IAA 含量は微量で、茎はその中間の値を示した。以上の結果より、組織の齢と状態によって IAA の移動速度および蓄積量が異なることが推察された。

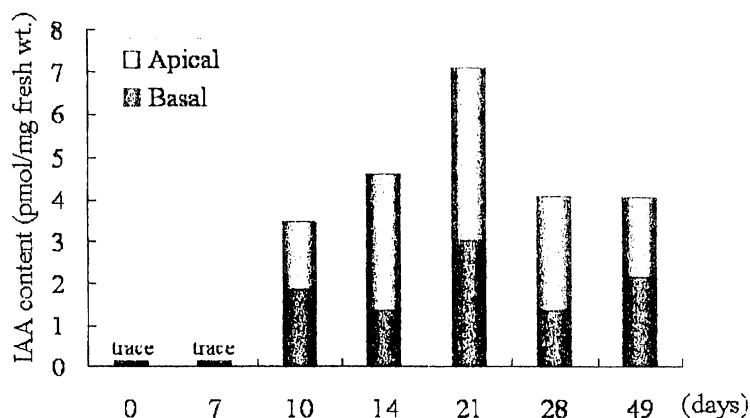


Fig. 3 不定芽形成過程の節間切片における IAA の含量と分布

<3>催吐アルカロイドの新規 HPLC 分析条件の確立

CP と EM の HPLC による同時定量法は、1989 年に Teshima らにより報告され、さらに 1993 年に、Yoshimatsu らによって逆相シリカゲルカラムを用いて改良された分析条件が報告された。この条件は、移動層にアセトニトリルと 10 mM sodium 1-heptanesulfonate を用いたイオンペア法であるが、トコンの根の抽出エキスを分析すると、CP と EM が標準品を分析した際の保持時間よりも 15~30 秒遅れて検出されるという問題点がある。加えて、これらの化合物のピークはブロードで、ピーク形状は非対称でテーリングを起こす。また、日本薬局方第十五改正に記載されている移動層の有機溶媒にメタノールを用いた分析条件においても、催吐アルカロイドのピーク形状は良好ではない。そこで、ピーク形状が良好かつ CP および EM の保持時間が試料と標準品とで差の小さい、トコンにおける催吐アルカロイドの新規 HPLC 条件を確立し、その条件を用いて生薬吐根および培養物の分析を行なった。

トコンの根の抽出試料を分析した際に生じる、CP および EM の保持時間の標準品との差を引き

起こす要因は、抽出試料中に含まれていると考えられる。そこで、根の抽出試料を分取 TLC により分画した。分取 TLC で得られた CP および EM に相当するバンドを回収し、それぞれの抽出液を HPLC 分析した結果、標準品における CP および EM の保持時間とほぼ一致した。しかし、分取 TLC で得られた CP および EM 画分の抽出液に他の部分の抽出液を混合して HPLC 分析を行なうと、CP および EM の保持時間は標準品よりも遅くなった。これにより、CP および EM の保持時間の標準品との差を引き起こす要因は、抽出試料中に含まれていることが判った。

以下の項目を検討し、催吐アルカロイドの新規 HPLC 条件を確立した。

(1) 有機溶媒

移動層の有機溶媒には、Yoshimatsu らの方法ではアセトニトリルが、日本薬局方ではメタノールが用いられているが、これをエタノールに換えることにより、ピーク形状がシャープになった。

(2) カウンターイオンの pH

20 mM sodium 1-heptanesulfonate の pH を 2% リン酸水溶液で 3.0, 3.5 および 4.0 に調整し、ピークの半値幅に対する影響を調査した。pH 3.5 において、抽出試料における CP および EM ピークの半値幅は、標準品におけるピークの半値幅とほぼ同等で、安定した分析を行なうことができると判明した。以後の実験において、カウンターイオン溶液の pH は 3.5 とした。

(3) カウンターイオンの種類

20 mM の濃度、pH 3.5 で調製した種々のカウンターイオン溶液をエタノールと混合し、HPLC 分析を行なった。CP および EM の保持時間およびピーク形状を考慮して混合比および流速を調整した。Yoshimatsu らの方法や日本薬局方でも用いられている sodium 1-heptanesulfonate とエタノールの混合液を用いた際に、根抽出試料中の化合物の分離が最も良好であり、加えて、標準品および抽出試料における CP および EM ピークの半値幅がほぼ一致しており、安定した分析を行なうことができた。

(4) 分析カラム

(3) まいでで確立できた新規分析条件では、カラムは TSKgel ODS-120A (東ソー) を使用し、カラム温度を 60 °C に設定している。この比較的高いカラム温度において CP, EM および未知化合物の分離に最適なカラムを検討するため、60 °C での使用がメーカーにより保証されている CAPCELL PAK C₁₈ MGII, ACR および UG120 (資生堂) を試験した。MGII を用いた場合、化合物の分離が今回行なった実験区中最も良好であった (Fig. 4)。また、今回使用した CAPCELL PAK C₁₈ シリーズのカラムの中では、MGII を用いた場合に、抽出試料中と標準品における CP および EM の保持時間の差が最も小さくなった。

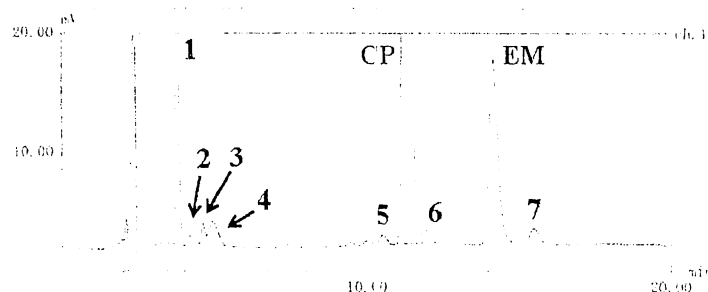


Fig. 4 新規 HPLC 分析条件によるトコン不定根抽出試料の HPLC チャート

これらの結果より、以下の条件を設定した。

カラム：CAPCELL PAK C₁₈ MGII (250 mm × 4.6 mm i.d., 資生堂)

移動層：20 mM sodium 1-heptanesulfonate (2%リン酸水溶液で pH 3.5 に調整) - エタノール (65:35)

流速：1.2 ml/min

カラム温度：60 °C

検出波長：285 nm (UV 検出器)

確立した条件下で CP および EM の検量線を作成したところ、HPLC 注入量で CP は 19.0 µg ま
で、EM は 18.3 µg までの濃度範囲で直線性を示し、検出限界は CP が 0.04 µg, EM が 0.07 µg であ
った。また、回収率を調べるために、トコンの培養不定根粉末に一定量の CP と EM を加えて抽
出し、本条件での回収率は、それぞれほぼ 100 % に近く良好な値であった。

生薬吐根を入手し、そのアルカロイド含量を本条件で分析した結果、カルタゲナ吐根は乾燥重
量当たり 7% 以上もの高い CP 含量を示した。リオトコンは、培養植物体では EM よりも CP 含量
の方が高いのに対し、生薬および長期栽培植物体は EM 含量の方が高いことが判っており、分析
した結果、リオ吐根は約 3 % の EM および約 2 % の CP を含有していた。

さらに、節間切片に形成された不定芽のアルカロイド含量を分析し、微量分析の可能性を探っ
た。高さ 6 mm, 乾燥重量 1.2 mg の不定芽についても、HPLC 分析が可能であった。

【総括】

トコンは重要な薬用植物であり、国内でトコン製剤が使用されるようになったことから、原料
植物の安定供給が望まれている。本研究において、GA₃ を用いることにより従来の増殖法と比較
しておよそ 120 倍の高効率の増殖法を確立した。また、本増殖法で増殖した植物のアルカロイド
含量は、従来の方法で増殖した植物体と同等である。トコンは、春から秋にかけて日本国内で圃
場栽培を行なうことが可能であり、本増殖法を用いて苗を用意し、一斉に圃場に植え出して栽培
することにより、原料植物の確保に寄与できると考えられる。

さらに、化合物の分離およびピーク形状が良好かつ微量の試料で精密な分析が可能な HPLC 分
析条件を確立することができた。本実験では植物試料の分析を行なったが、トコン製剤服用の際
の血中および尿中の催吐アルカロイド含量の分析等、医療分野への応用が期待できる。